

## クロレラの細胞内共生は宿主ミドリゾウリムシの細胞表層直下のトリコシストの配列を変化させる

児玉 有紀<sup>1,2</sup>, 藤島 政博<sup>1</sup> (<sup>1</sup>山口大・院理工・環境共生系, <sup>2</sup>学振PD)

### Endosymbiosis of *Chlorella* species to *Paramecium bursaria* alters an arrangement of the host's trichocysts beneath the host cell surface

Yuuki KODAMA<sup>1,2</sup> and Masahiro FUJISHIMA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Env. Sci. and Engineering, Grad. School of Sci. and Engineering, Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Res. Fellow of JSPS PD.)

#### SUMMARY

Each symbiotic *Chlorella* species of the ciliate *Paramecium bursaria* is enclosed in a perialgal vacuole membrane derived from the host digestive vacuole membrane. Algae-free paramecia and symbiotic algae can grow independently and can be reinfected experimentally by mixing them. Previously, we reported that the symbiotic algae appear to push the trichocysts aside to become fixed near the host cell surface during the algal reinfection process. Indirect immunofluorescence microscopy with a monoclonal antibody against host trichocysts demonstrated that trichocysts changed their arrangement to form a ring, surrounding the algae localized beneath the host cell surface during algal reinfection. In contrast, removal of symbiotic algae from algae-bearing cells by treatment with the protein-synthesis inhibitor cycloheximide induced recovery of both the distribution and the density of the host trichocysts. These results suggest that symbiotic algae compete with preexisting trichocysts for their attachment sites beneath the host cell surface.

**[目的]** ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の細胞質内には、約 700 個のクロレラが細胞内共生している。各クロレラは宿主のリソソームが融合しない perialgal vacuole (PV) 膜に包まれている。共生クロレラの大部分は原形質流動によって移動せず、トリコシストが多数存在する宿主細胞表層直下に接着している。細胞表層直下への接着は細胞分裂時における共生クロレラの娘細胞への均等分配を保証し<sup>1)</sup>、クロレラのミドリゾウリムシへの共生能の有無を決定する<sup>2)</sup>。さらにこの現象はミドリゾウリムシの共生クロレラだけではなく、他の原生動物と藻類との細胞内共生でもみられる普遍的な現象であるが<sup>3)</sup>、共生藻の接着部位やその仕組みは明らかにされていない。我々は、クロレラ除去細胞からリゾチームでトリコシストを除去し、これにクロレラを与えると、クロレラはより高密度に細胞表層直下に接着することを明らかにした。この結果はクロレラとトリコシストが細胞表層の接着場所を奪い合っている可能性を示唆している<sup>4)</sup>。そこで本研究では、トリコシストに対するモノクローナル抗体を作成し、クロレラの再共生と除去に伴うトリコシストの量的変化を間接蛍光抗体法で調べた。

#### [材料と方法]

##### 抗トリコシストモノクローナル抗体の作製

*P. bursaria* (OS1g1N 株) の細胞のホモジネートを BALB/c マウスに感作し、ハイブリドーマを得た。次に、ハイブリドーマの培養上清を間接蛍光抗体法で

アッセイして、トリコシストを認識する抗体を産生するハイブリドーマを 2 回の限界希釈法でクローニングした。

##### シクロヘキシミド処理によるクロレラの除去

5,000 cells/ml に調整した *P. bursaria* (OS1g1N 株) にシクロヘキシミド (Wako) を最終濃度が 10 µg/ml になるように加え、その後 25 ± 1 °C、恒明条件下でインキュベートした<sup>5)</sup>。

##### クロレラの再共生

クロレラを除去した *P. bursaria* (Yad1w株) 5,000 cells/ml と、OS1g1N 株から単離した共生クロレラを 1 : 10<sup>4</sup> の細胞密度で混合し、25 ± 1 °C、恒明条件下で 1.5 分間のパルスラベルを行った。その後、15 µm のナイロンメッシュで濾過して、ドリルの液で細胞を洗浄し外液のクロレラを除去した。

##### 間接蛍光抗体法

上記の方法で、クロレラを除去または再共生させた細胞を経時的にマイクロカバーガラス上で風乾後、4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体に抗トリコシストモノクローナル抗体を用い、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識-抗マウス IgG を用いた間接蛍光抗体法で調べた。

#### [結果]

##### 抗トリコシストモノクローナル抗体の性質

本研究に用いた抗トリコシストモノクローナル抗体の抗原決定基は、間接蛍光抗体法では発射前後のトリコシストの両方に存在していた。またこの抗原

決定基は観察に用いた全てのミドリゾウリムシ 18 株や、*P. caudatum*、*P. putrinum*、*P. duboscqui* 等のトリコシストにも存在していた。

#### クロレラを除去した細胞を用いた間接蛍光抗体法

ミドリゾウリムシをシクロヘキシミドで処理すると、処理してから 24 時間後には大部分のクロレラの消化が誘導され、9 日後には観察した大部分の細胞内のクロレラが完全に消失していた。この時の間接蛍光抗体法の結果から、細胞内のクロレラ数の減少に伴い、宿主トリコシスト数が増加することが明らかになった。

#### クロレラを再共生させた細胞を用いた間接蛍光抗体法

クロレラと混合する前のクロレラ除去細胞では、トリコシストが高密度で存在していた。この細胞と共生クロレラを混合すると、30 分以降にクロレラの食胞膜からの脱出が始まり、3 時間後には宿主細胞表層直下に接着したクロレラが観察された。この時の間接蛍光抗体法の結果から、表層直下に接着するクロレラを取り囲むようにして、その部分のトリコシストがリング状に配列を変化させることが明らかになった。細胞内共生を成立させたクロレラは24時間以降は細胞分裂によって増殖する。細胞内のクロレラ数の増加に伴ってトリコシストのリング状の配列は増加し、トリコシストの総数は減少した。

**【考察】** 今回の観察結果から、クロレラの除去または再共生過程において、共生クロレラがトリコシスト数や配列を変化させている可能性が示唆された。トリコシストの行方については、再共生過程において

細胞外液に目立って放出されたトリコシストは観察されないので、細胞外に放出されたのではないと考えられる。大村と洲崎は、クロレラの再共生におけるクロレラ数の減少に伴って、トリコシストの周りに直径 0.5  $\mu\text{m}$  の電子密度の高い顆粒が多数出現するのを電顕で観察しており、この顆粒がトリコシストの減少に関与している可能性を示唆している<sup>6)</sup>。一方、Gu *et al.* は恒暗条件下で培養したミドリゾウリムシを、リソソームの指標酵素である酸性フォスファターゼ活性を検出するゴモリ染色液で染色すると、トリコシストの周辺に酵素活性を示す沈殿物が検出されたと報告している<sup>7)</sup>。我々もクロレラの再共生過程において同様の観察結果を得ている。これらの結果はトリコシストを包む膜にリソソームが融合し、トリコシストが消化された可能性を示している。今後は電顕観察や、クロレラまたは宿主のタンパク質合成を阻害した場合の影響などを調べることによって、共生クロレラによる宿主トリコシストの調節機構の仕組みを明らかにしたい。

#### 【文献】

- 1) Tonooka and Watanabe (2002) *Eur. J. Protistol.*, 38, 55-58.
- 2) Kodama and Fujishima (2007) *Protoplasma*, 231, 55-63.
- 3) Reisser (1986) *Prog. Protistl.*, 1, 195-214.
- 4) Kodama and Fujishima (2009) *Protist*, 160, 65-74.
- 5) Kodama and Fujishima (2008) *Protist*, 159, 483-494.
- 6) Omura and Suzaki (2003) *Jpn. J. Protozool.*, 36, 69-70.
- 7) Gu *et al.* (2002) *Eur. J. Protistol.*, 38, 267-278.